

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-247574

(P2001-247574A)

(43) 公開日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 0 7 D 491/08		C 0 7 D 491/08	
A 6 1 K 31/407		A 6 1 K 31/407	
A 6 1 P 31/04		A 6 1 P 31/04	
35/00		35/00	
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-397813 (P2000-397813)	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
(22) 出願日	平成12年12月27日 (2000. 12. 27)	(72) 発明者	小泉 文人 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平11-372825	(72) 発明者	長谷川 淳博 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(32) 優先日	平成11年12月28日 (1999. 12. 28)	(72) 発明者	安藤 勝彦 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

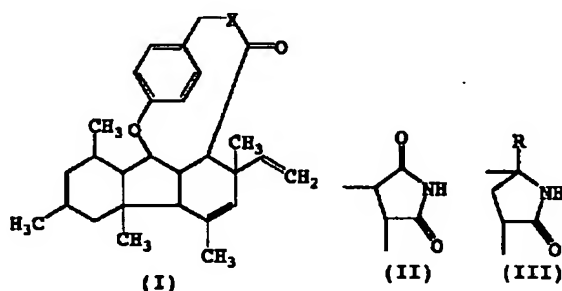
(54) 【発明の名称】 生理活性物質 GKK1032 化合物

(57) 【要約】

【課題】 抗菌剤または抗腫瘍剤として有用な生理活性物質を提供すること。

【解決手段】

【化 1 4】



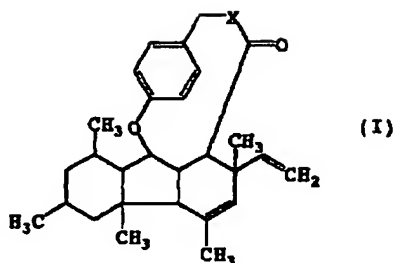
(式中、Rはヒドロキシまたは低級アルコキシを表す)  
上記式 (I) [式中、Xは上記式 (I I) または上記式 (I I I) で表される基を表す] で表される生理活性物

質GKK1032化合物またはその薬理学的に許容される塩を提供する。

【特許請求の範囲】

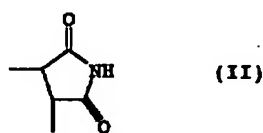
【請求項1】 式(I)

【化1】



【式中、Xは式(II)

【化2】



または式(III)

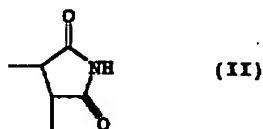
【化3】



【式中、Rはヒドロキシまたは低級アルコキシを表す）  
で表される基を表す】で表される生理活性物質GKK1032  
化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項2】 Xが式(II)

【化4】



で表される基である請求項1記載の生理活性物質GKK1032  
化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項3】 Xが式(III)

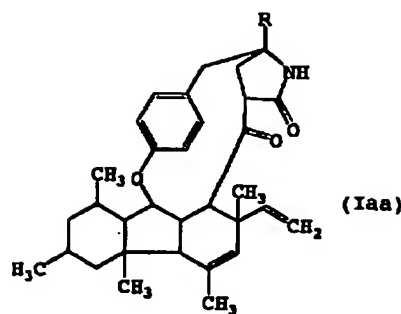
【化5】



【式中、Rは前記と同義である）で表される基である請  
求項1記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬  
理学的に許容される塩。

【請求項4】 式(Iaa)

【化6】



【式中、Rは前記と同義である）で表される生理活性物  
質GKK1032化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項5】 Rがメトキシである請求項3または4記  
載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理学的に  
許容される塩。

【請求項6】 Rがヒドロキシである請求項3または4  
記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理学的  
に許容される塩。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載の生理活  
性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシリ  
ウム属に属する微生物を培養し、その培養物より該生理  
活性物質を取得することを特徴とする該生理活性物質の  
製造方法。

【請求項8】 請求項1～6のいずれかに記載の生理活  
性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシリ  
ウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) GKK1032株 (F  
ERM BP-6834) を培養し、その培養物より該  
生理活性物質を取得することを特徴とする該生理活性物  
質の製造方法。

【請求項9】 請求項1～6のいずれかに記載の生理活  
性物質GKK1032化合物またはその薬理学的に許容される  
塩を有効成分として含有する医薬。

【請求項10】 請求項1～6のいずれかに記載の生理  
活性物質GKK1032化合物またはその薬理学的に許容され  
る塩を有効成分として含有する抗菌剤。

【請求項11】 請求項1～6のいずれかに記載の生理  
活性物質GKK1032化合物またはその薬理学的に許容され  
る塩を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項12】 請求項1～6のいずれかに記載の生理  
活性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシ  
リウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) GKK1032株  
(FERM BP-6834)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗菌・抗腫瘍作用  
を有し、抗菌剤・抗腫瘍剤として有用な生理活性物質GK  
K1032化合物またはその薬理学的に許容される塩に関す  
る。

【0002】

【従来の技術】従来、抗腫瘍剤としてはアドリマイシ

ン、アクチノマイシン等が使用されているが、効力や毒性等の点で不十分であり、また耐性等の問題もあり、新しい抗腫瘍剤が求められている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、優れた抗菌または抗腫瘍作用を有する化合物を提供することにある。

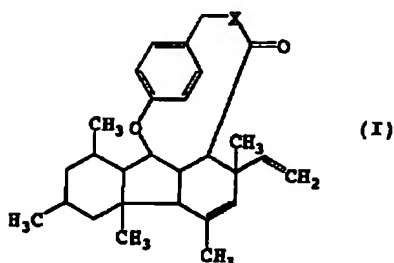
【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、微生物代謝産物中に抗菌または抗腫瘍作用を有する新規生理活性物質GKK1032化合物が生産されていることを見出した。すなわち本発明は、以下の(1)～(12)に関する。

(1) 式(I)

【0005】

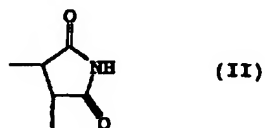
【化7】



【0006】〔式中、Xは式(II)〕

【0007】

【化8】



【0008】または式(III)

【0009】

【化9】

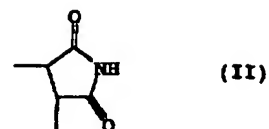


【0010】(式中、Rはヒドロキシまたは低級アルコキシを表す)で表される基を表す]で表される生理活性物質GKK1032化合物〔以下、化合物(I)という〕またはその薬理的に許容される塩。

(2) Xが式(II)

【0011】

【化10】

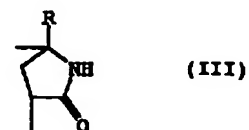


【0012】で表される基である上記(1)記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩。

(3) Xが式(III)

【0013】

【化11】

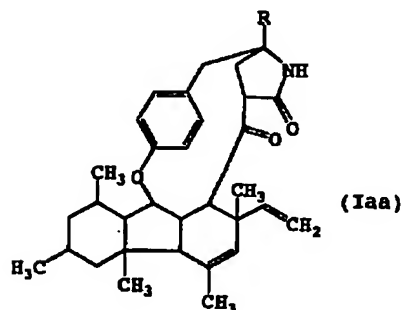


【0014】(式中、Rは前記と同義である)で表される基である上記(1)記載の生理活性物質GKK1032化合物〔以下、化合物(Ia)という〕またはその薬理的に許容される塩。

(4) 式(Iaa)

【0015】

【化12】



【0016】(式中、Rは前記と同義である)で表される生理活性物質GKK1032化合物〔以下、化合物(Ia)という〕またはその薬理的に許容される塩。

(5) Rがメトキシである上記(3)または(4)記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩。

(6) Rがヒドロキシである上記(3)または(4)記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩。

(7) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシリウム属に属する微生物を培養し、その培養物より該生理活性物質を取得することを特徴とする該生理活性物質の製造方法。

【0017】(8) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシリウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) G

KK1032株 (FERM BP-6834) を培養し、その培養物より該生理活性物質を取得することを特徴とする該生理活性物質の製造方法。

(9) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

(10) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する抗菌剤。

(11) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

(12) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の生理活性物質GKK1032化合物を生産する能力を有するペニシリウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) GKK1032株 (FERM BP-6834)。

#### 【0018】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。式(III)の定義において、低級アルコキシの低級アルキル部分としては、炭素数1～8の直鎖または分岐状の、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等があげられる。

【0019】化合物(I)の薬理的に許容される塩は、薬理的に許容される金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩を包含する。金属塩としてはリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられ、有機アミン付加塩としてはモルホリン、ピペリジン等の付加塩、アミノ酸付加塩としては、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン等の付加塩があげられる。

【0020】また、化合物(I)またはその薬理的に許容される塩は、水あるいは各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、それら付加物も本発明に包含される。次に化合物(I)の製造法について説明する。化合物(I)は、ペニシリウム(*Penicillium*)属に属し化合物(I)を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に化合物(I)を生成蓄積させ、該培養物から化合物(I)を採取することによって製造される。

【0021】化合物(I)を生産する能力を有する微生物としては、ペニシリウム属に属し、化合物(I)を生産する能力を有する菌株であればいずれの菌株でも用いることができる。また、これらの菌株を人工的変異法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理等によって変異させた変異株あるいは自然に変異した変異株でも化合物(I)を生産する能力を有するものであれば本発明に用いることができる。

【0022】具体的に好適な例として、ペニシリウム・スピーシーズ (*Penicillium* sp.) GKK1032株があげられる。本発明者らは、土壌より新たに分離したペニシリウム属に属する糸状菌GKK1032株が、抗菌または抗腫瘍作用を有する化合物(I)を生産することを見出した。

【0023】本発明の生理活性物質を生産する代表菌株(GKK1032)は土壌より分離したもので、その菌学的性質は以下のとおりである。

#### 1. 肉眼的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で11～16mm、培養14日目で22～27mmに達する。集落の表面は灰色がかった濃緑色を呈する。また、集落裏面はクリーム色から淡橙色を呈する。

【0024】バレイショ・ブドウ糖寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で22～26mm、培養14日目で24～30mmに達する。集落の表面は中央部は灰色から暗灰色を呈し、周囲は淡灰緑色を呈する。また、部分的に淡赤色の侵出物が見られる。集落の裏面は明黄褐色から暗黄褐色を呈する。培地中には褐色系の色素を出す。

【0025】本菌株の至適生育温度は10～36.5℃で、32℃付近で最も良好に生育する。生育するpHは2～12で、pH9前後で最も良好に生育する。

#### 2. 光学顕微鏡的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃で2週間培養したときの本菌株の光学顕微鏡による観察結果は以下のとおりである。

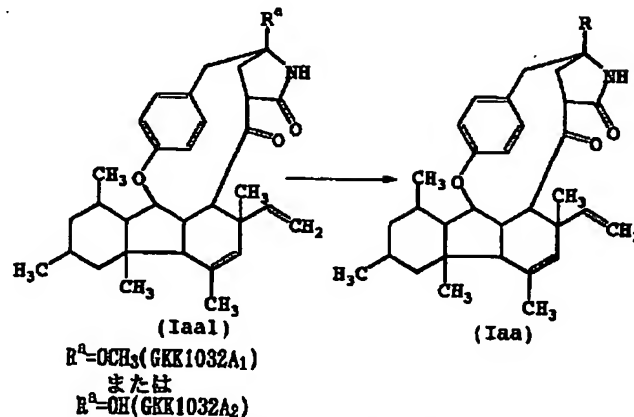
【0026】菌糸は隔壁を有し、幅1.5～5μm、平滑でよく分岐する。分生子柄は束状になることはなく、菌糸から単生し、立ち上がる。分生子柄は、平滑で、隔壁を有し、長さは300μmに至る。分生子柄の先端に3～5本のメトレを形成し、各メトレの先端に多数のフィアライドを形成する。メトレは、無色、平滑、単細胞で、へら形あるいは長方形を呈し、長さ8～18μm、幅2～4μmである。フィアライドはトックリ形を呈し、無色、平滑で、長さ7～10.5μm、幅は最も広い部位において2.5～3.5μm、先端部は幅1.0～1.5μmである。分生子はフィアライド先端から多数形成される。分生子の個体発生様式は内生出芽型であり、その形成様式はフィアロ型である。フィアロ型分生子は単細胞、球形～亜球形で、その表面は平滑あるいは微小な刺状を呈し、直径2.0～3.0μmである。本菌株では上述したアナモルフのみ観察され、テレオモルフは観察されなかった。

【0027】以上の菌学的性質より、本菌株の分類学的位置を「ザ・ジェネラ・オブ・ファンジャイ・スポルレイティング・イン・ピュア・カルチャー 第2版(The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 2nd ed.), Cramer, Vaduz, J. A. Von Arx, 1974年」に従って検索した結果、本菌は糸状不完全菌類のペニシリウム(*Penicillium*)属に属することが明らかとなった。本発

明者らは、本菌株を「ペニシリウム・スピーシーズGKK1032(Penicillium sp. GKK1032)」と命名し、平成11年8月11日付で、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に受託番号FERM BP-6834として寄託した。

【0028】本発明の化合物(I)生産菌の培養に際しては糸状菌の培養に用いられる通常の培養方法が適用される。培地としては、用いられる菌の資化しうる炭素源、窒素源、無機物を程よく含有する培地であれば天然培地、合成培地いずれでも用い得る。炭素源としては、グルコース、澱粉、デキストリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜等が単独または組み合わせて用いられる。さらに、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸等も用いられる。

【0029】窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸等が単独または組み合わせて用いられる。そのほか、必要に応じて塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、りん酸二水素カリウム、りん酸マグネシウム・8水塩、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガ、硫酸亜鉛、硫酸銅等の無機塩類を加えることができる。さらに、使用菌の生育や化合物(I)の生産を促進する微量成分を適当に添加することもできる。



【0034】(式中、 $\text{R}^a$ はヒドロキシまたはメトキシを表し、 $\text{R}$ は前記と同義である)

化合物(I a a)は、GKK1032A<sub>1</sub>またはGKK1032A<sub>2</sub>を、必要により不活性溶媒中、酸の存在下、1当量～過剰量の $\text{R}^a\text{H}$ (式中、 $\text{R}$ は前記と同義である)と反応させることにより得ることができる。不活性溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類等があげられ、 $\text{R}^a\text{H}$ (式中、 $\text{R}$ は前記と同義である)は溶媒を兼ねて用いられる場合もある。酸としては、塩酸、硫酸等の無機酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸があげられる。反応は0℃～使用する溶媒の沸点の

【0030】培養は、振とう培養法、攪拌培養法等により、20～40℃の温度で中性～アルカリ性のpHで行われる。通常1～7日の培養によって化合物(I)の蓄積が最大に達し、培養は完了する。培養物中に蓄積した化合物(I)を培養物から単離精製する際には、通常の微生物代謝産物を培養物から精製する方法が使用される。

【0031】すなわち、アセトン、メタノール等の溶剤による菌体成分の抽出、ろ過、遠心分離等による菌体除去、吸着樹脂、シリカゲル、シラナイズドシリカゲル、逆相シリカゲル、アルミニウム、セルロース、ケイそう土、ケイ酸マグネシウム、ゲルろ過剤、イオン交換樹脂等を用いるカラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる活性物質の吸脱着処理、適当な溶媒系による分配等によって化合物(I)は単離される。

【0032】上記精製工程中の化合物(I)の検出は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー、ついで硫酸発色、または253.6nmの紫外線照射法等により行うことができる。また、化合物(I a a)は、酸性条件下、水溶液中または低級アルコール溶液中で、置換基 $\text{R}$ 部分が容易に置換反応を受け、対応するヒドロキシまたは低級アルコール置換体に変換される。これを利用し、化合物(I a a)は、次の反応工程によっても製造することができる。

【0033】  
【化13】

間の温度、好ましくは20～50℃の間の温度で行われ、1～72時間で終了する。

【0035】化合物(I)の塩を取得したい場合には、化合物(I)の塩が得られるときはそのまま精製すればよく、また遊離の形で得られるときは適当な溶媒に溶解または懸濁し、塩基を加え、塩を形成させればよい。化合物(I)の具体例を以下の第1表に示す。

【0036】  
【表1】

第1表

化合物名	X
GKK1032A <sub>1</sub>	
GKK1032A <sub>2</sub>	
GKK1032A <sub>3</sub>	
GKK1032B	

【0037】次に、化合物(I)の抗菌および抗腫瘍作用について試験例で説明する。

試験例1 : 細菌に対する抗菌作用

GKK1032Bの細菌に対する最小生育阻止濃度(MIC)について、バクトトリプトン(DIFCO社製)3g/L、肉エキス3g/L、酵母エキス1g/L、グルコース1g/L、寒天16g/Lの組成からなる培地(pH7.0)を用いて寒天希釈法により測定した。その結果を第2表に示す。

【0038】

【表2】

被検菌	MIC (μg/ml)
バチルス・ズブチリス	20.8
<i>Bacillus subtilis</i> NO.10707	

【0039】第2表により、GKK1032Bは抗菌作用を有することが示された。

試験例2 : ヒト子宮頸癌由来上皮様細胞HeLa S3に対する増殖阻害作用

96穴マイクロタイタープレートの各穴に10%牛胎児血清を含むDME培地(ニッスイ社製; 以下培地Aと称す)で2×10<sup>4</sup>個/mlに調製したHeLa S3細胞を分注した。該プレートを炭酸ガスインキュベーター内で37℃、12時間培養後、

これに培地Aにより適宜希釈した化合物(I)を10μlずつ加え、炭酸ガスインキュベーターで37℃で培養した。培養72時間後、XTT染色法[J. Immunol. Methods, 94, 57-63 (1986); J. Immunol. Methods, 147, 153-165 (1992)参照]で生細胞数を測定し、化合物(I)非処理時の生細胞数と比較することにより、増殖阻害のIC<sub>50</sub>(μmol/L)を算出した。結果を第3表に示す。

【0040】

【表3】

化合物	IC <sub>50</sub> (μmol/L)
GKK1032B	17.7
GKK1032A <sub>1</sub>	31.6
GKK1032A <sub>2</sub>	18.5

【0041】第3表により、化合物(I)はヒト子宮頸癌由来上皮様細胞に対して増殖抑制作用を有することが示された。化合物(I)およびその薬理学的に許容される塩は、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤等の通常適用される剤形に調製して、経口的に、あるいは静脈内注射等の非経口的投与で投与することができる。それらの経口的または非経口的に投与する剤形の製剤化には、通常知られた方法が適用され、該製剤は、例えば各種の賦形剤、潤沢剤、結合剤、崩壊剤、懸濁化剤、等拡張剤、乳化剤等を含有してもよい。

【0042】使用する製剤担体としては、例えば白糖、ゼラチン、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、タルク、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、デンブ、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、繊維素グルコール酸カルシウム、尿素、シリコン樹脂、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン酸エステル、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油、エタノール等があげられる。

【0043】化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なる。通常、成人一人あたり、一回につき1~1000mgの範囲で、一日一回あるいは成人一人あたり一回につき1~100mgの範囲で、一日一回から数回経口または非経口投与される。もちろん、前記したように投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲も超えて投与の必要な場合もある。

【0044】以下に、本発明の実施例を示す。なお、以下の理化学的データは下記の機器により測定した。

融点：柳本製作所 微量融点測定計

FABマスペクトルおよび高分解能FABマスペクトル：

日本電子 JMS-HX/HX110A型質量分析装置

比旋光度：日本分光工業 DIP370型デジタル旋光計

紫外外部吸収スペクトル：島津製作所 UV-1600PC型紫外吸収分光計

赤外部吸収スペクトル：日本電子 JIR-RFX3001型赤外吸収分光計；日本分光 IR-810型赤外吸収分光光度計

核磁気共鳴スペクトル：日本電子 JNM- $\alpha$ 400型核磁気共鳴装置 ( $^1\text{H}$ -NMR：400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR：100 MHz)；ブルカー DMX500型核磁気共鳴装置 ( $^1\text{H}$ -NMR：500 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR：125 MHz)

【0045】

【実施例】実施例1： GKK1032B

種菌として、ペニシリウム・スピーシーズGKK1032株を用い、第一種培地としてマッシュポテト30g/L、グルコース100g/L、イーストエキストラクト5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。

【0046】種菌1白金耳を、50ml大型試験管に入れた第一種培地10mlに植菌し、試験管2本(合計培地量20ml)を25℃で2日間振とう培養した。この第一種培養液20mlを300ml容三角フラスコに入った50mlの第二種培地に5mlずつ(合計フラスコ4本、200ml)植菌した。第二種培地の組成は第一種培地の組成と同じである。第二種培養は25℃での2日間振とう培養により行った。

【0047】得られた第二種培養液200mlを300ml容三角フラスコに入った主発酵培地50mlに5mlずつ(合計バッフル40本、2L)植菌した。主発酵培地としては、シュクロース30g/L、スターチ20g/L、エビオス5g/L、モルトエキストラクト10g/L、コーン・ステアーブ・リカー5g/L、V8野菜ジュース(サントリー社製)200ml/L、炭酸カルシウム5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。主発酵培養は25℃、7日間のロータリーシェーカーでの攪拌培養(回転数：220rpm)により行った。

【0048】得られた主発酵培養液2Lから吸引ろ過により上清を分離し、得られた上清を400mlのダイアイオンHP-20カラム(三菱化学社製、東京)に通塔し、20%メタノール水溶液10L、および50%メタノール水溶液1.6Lで洗浄した後、100%メタノール1.6Lで溶出した。GKK1032Bを含む画分を集め、水で2倍に希釈して、125mlのダイアイオンHP-20ssカラム(三菱化学社製、東京)に通塔し、70%メタノール水溶液500ml、80%メタノール水溶液500ml、および90%メタノール水溶液500mlで洗浄後、100%メタノール500mlで溶出させた。GKK1032Bを含む画分を集め、減圧乾固後、メタノール1mlに溶解させた。このうち、0.2mlをHPLCカラム(Develosil ODS HG-5、野村化学社製)に通塔後、流速10ml/分の条件で、80%アセトニトリル水溶液に0.1%のトリフルオロ酢酸を加えた溶媒で溶出させて、GKK1032Bを含む画分を集めた。このHPLCを用いた精製を繰り返し行い、GKK1032Bを含む画分を集めて減圧乾

固することにより、GKK1032Bを53.2mg得た。

【0049】なお、上記工程中のGKK1032Bの検出は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー、ついでヨウ素発色、または253.6nmの紫外線照射法により行った。

(GKK1032Bの理化学的データ)

性状：白色の固体

融点：159-161℃

分子量：501

分子式： $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{NO}_4$

FABマスペクトル： $m/z$

ポジティブモード：502 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

ネガティブモード：500 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

高分解能FABマスペクトル： $m/z$

ネガティブモード：測定値；500.2803 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

$\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{NO}_4$ としての計算値；500.2800

比旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +172^\circ$  (c 0.2,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

紫外外部吸収スペクトル： $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH})$  nm( $\epsilon$ )；202 (23,000), 230 (sh. 4,600)

【0050】赤外部吸収スペクトル： $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})$   $\text{cm}^{-1}$ ；3417, 2947, 2922, 2866, 1772, 1711, 1500, 1456, 1346, 1234, 1223, 1176, 931, 731

$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル (100 MHz, Benzene- $d_6$ )： $\delta$  ppm

(多重度)；200.0 (s), 175.7 (s), 169.8 (s), 159.9 (s), 146.0 (d), 138.0 (s), 134.2 (s), 133.6 (d), 133.1 (d), 132.2 (d), 126.7 (d), 120.4 (d), 114.0 (t), 92.8 (d), 61.7 (d), 61.4 (d), 60.7 (d), 55.3 (d), 54.1 (d), 49.5 (t), 45.4 (t), 43.7 (d), 42.1 (s), 41.3 (s), 35.0 (t), 28.1 (d), 27.4 (d), 25.2 (q), 22.9 (q), 20.6 (q), 20.0 (q), 16.5 (q)

$^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400 MHz, Benzene- $d_6$ )： $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数 J(Hz))；6.91 (1H, dd, J=8.2, 2.1), 6.69 (1H, dd, J=8.4, 2.4), 6.65 (1H, dd, J=8.2, 2.4), 6.53 (1H, br.), 6.34 (1H, dd, J=8.4, 2.1), 5.53 (1H, dd, J=17.6, 10.7), 5.24 (1H, br.), 4.85 (1H, dd, J=17.6, 1.4), 4.77 (1H, dd, J=10.7, 1.4), 3.94 (1H, dd, J=7.1, 3.6), 3.73 (1H, ddd, J=11.3, 8.1, 5.2), 3.43 (1H, dd, J=12.6, 8.1), 3.13 (1H, d, J=9.9), 2.57 (1H, d, J=5.2), 2.37 (1H, dd, J=12.1, 9.9, 3.6), 2.00 (1H, dd, J=12.6, 11.3), 2.00 (1H, m), 1.90 (1H, br. d, J=12.1), 1.82 (1H, m), 1.80 (3H, s), 1.7-1.6 (2H, m), 1.43 (3H, s), 1.18 (3H, d, J=6.3), 1.14 (3H, s), 0.89 (3H, d, J=6.4), 0.79 (1H, dd, J=11.2, 7.1), 0.63 (1H, dd, J=12, 12), 0.54 (1H, ddd, J=12, 12, 12)

溶解性：メタノール、クロロホルムに易溶

呈色反応：ヨウ素、硫酸に陽性

薄層クロマトグラフィー(Rf値)：0.25

展開溶媒：クロロホルム

薄層：HPTLC-Platten kieselgel 60 F<sub>254</sub> (メルク社製)

展開方法：室温、上昇法、20分

検出：硫酸発色

【0051】実施例2： GKK1032A<sub>1</sub> およびGKK1032A<sub>2</sub> 種菌として、ペニシリウム・スピーシーズGKK1032株を用い、第一種培地としてマッシュポテト30g/L、グルコース100g/L、イーストエキストラクト5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。

【0052】種菌1白金耳を、50ml太型試験管に入れた第一種培地10mlに植菌し、試験管2本(合計培地量20ml)を25℃で2日間振とう培養した。得られた第一種培養液20mlを、300ml容三角フラスコに入った50mlの第二種培地に5mlずつ(合計フラスコ4本、200ml)植菌した。第二種培地の組成は第一種培地の組成と同じである。第二種培養は25℃での2日間振とう培養により行った。

【0053】得られた第二種培養液のうち、90mlを、2L容三角フラスコに入った300mlの第三種培地に30mlずつ(合計フラスコ3本、900ml)植菌した。第三種培地の組成は第一種培地の組成と同じである。第三種培養は25℃での2日間振とう培養により行った。得られた第三種培養液のうち、450mlを、5L容量のジャーファーマンターに入れた主発酵培地3Lに150mlずつ(合計ジャーファーマンター3器、9L)植菌した。主発酵培地としては、シュクロース30g/L、スターチ20g/L、エビオス5g/L、モルトエキストラクト10g/L、コーン・ステープ・リカー5g/L、V8野菜ジュース(サントリー社製)200ml/L、炭酸カルシウム5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。主発酵培養は25℃、6日間の通気攪拌培養(3器のジャーファーマンターの回転数はそれぞれ300rpm、400rpm、500rpm、通気量はいずれも3リットル/分)により行った。

【0054】得られた主発酵培養液9Lから吸引ろ過により菌体と上清を分離し、得られた菌体に4Lのメタノールを加え攪拌後ろ過した。ろ液に9Lの脱イオン水を添加し、800mlのダイアイオンHP-20カラム(三菱化学社製、東京)に通塔した。カラムを50%メタノール水溶液3.2Lで洗浄した後、100%メタノール3.2Lで溶出した。100%メタノール溶出画分を、脱イオン水を2L添加することにより希釈して、250mlのダイアイオンHP-20ssカラム(三菱化学社製、東京)に通塔し、70%メタノール水溶液1L、80%メタノール水溶液1L、90%メタノール水溶液1L、および100%メタノール1Lで順次溶出した。溶出液を減圧下で濃縮し、90%メタノール水溶液溶出画分よりGKK1032A<sub>1</sub>を含む油状物質1.8gを、100%メタノール溶出画分よりGKK1032A<sub>2</sub>を含む油状物質2.2gをそれぞれ得た。

【0055】GKK1032A<sub>1</sub>を含む油状物質1.7gを少量のクロロホルムに溶解後、250mlのシリカゲルカラム(ワコーゲルC-200、和光純薬社製)に通塔し、95:5 クロロホルム/メタノールで溶出されるGKK1032A<sub>1</sub>を含む画分を集めて減圧濃縮し、粗精製物561.9mgを得た。これを少量の85%アセトニトリル水溶液に溶解後、200mlの逆相シリカゲルカラム(YMC-GEL ODS-AQ 120-S50、ワイエムシ社製)に通塔し、流速10ml/分の条件で、85%アセトニ

トリル水溶液で溶出させた。GKK1032A<sub>1</sub>を含む画分を集め、減圧乾固後、メタノールを少量含むアセトニトリル2mlに溶解させた。このうち、0.4mlをHPLCカラム(YMC-Pack ODS-AM SH-343-5AM、ワイエムシ社製)に通塔後、流速10ml/分の条件で、70%アセトニトリル水溶液で溶出させて、GKK1032A<sub>1</sub>を含む画分を集めた。このHPLCを用いた精製を繰り返し行い、GKK1032A<sub>1</sub>を含む画分を集め、溶出液を減圧乾固した。これを少量のクロロホルムに溶解後、16mlのシリカゲルカラム(ワコーゲルC-200、和光純薬社製)に通塔し、99.5:0.5 クロロホルム/メタノールで溶出されるGKK1032A<sub>1</sub>を含む画分を集めて減圧乾固することにより、GKK1032A<sub>1</sub>を11.5mg得た。

【0056】前述のGKK1032A<sub>2</sub>を含む油状物質2.2gのうち0.5gを少量の80%アセトニトリル水溶液に溶解後、200mlの逆相シリカゲルカラム(YMC-GEL ODS-AQ 120-S50、ワイエムシ社製)に通塔し、流速10ml/分の条件で80%アセトニトリル水溶液で溶出した。GKK1032A<sub>2</sub>を含む画分を集め、減圧乾固後、メタノールを少量含むアセトニトリル1mlに溶解させた。これをHPLCカラム(YMC-Pack ODS-AM SH-343-5AM、ワイエムシ社製)に通塔後、流速10ml/分の条件で、65%アセトニトリル水溶液で溶出させた。GKK1032A<sub>2</sub>を含む画分を集めて減圧乾固し、少量のクロロホルムに溶解後、分取用薄層クロマトグラフィー板(PLC plate 20x20cm Silica gel 60F<sub>254</sub>, 0.5mm、メルク社製)に塗布した。1:1 ヘキサン/酢酸エチルで展開後、GKK1032A<sub>2</sub>を含むバンドを掻き取り、1:2 ヘキサン/酢酸エチルでこれを抽出した。シリカゲルをろ過して除去した後、ろ液を減圧乾固することにより、GKK1032A<sub>2</sub>を8.2mg得た。

【0057】なお、上記工程中の化合物(I)の検出は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー、ついでヨウ素発色、または253.6nmの紫外線照射法により行った。

【0058】(GKK1032A<sub>1</sub>の理化学的データ)

性状：白色の固体

融点：238-239℃

分子量：517

分子式：C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub>

FABマスペクトル：m/z

ポジティブモード：518 (M+H)<sup>+</sup>

ネガティブモード：516 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能FABマスペクトル：m/z

ネガティブモード：測定値：516.3134 (M-H)<sup>-</sup>

C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>4</sub>としての計算値：516.3114

比旋光度：[α]<sub>D</sub><sup>19</sup> = +87° (c 0.4, CH<sub>3</sub>OH)

紫外吸収スペクトル：λ<sub>max</sub>(CH<sub>3</sub>OH) nm(ε)；209 (19,200), 225 (sh. 12,400)

【0059】赤外部吸収スペクトル：ν<sub>max</sub>(KBr) cm<sup>-1</sup>；3266, 2950, 2924, 2850, 1691, 1603, 1506, 1459, 1371, 1222, 1164, 1111, 1096, 1058, 1008, 954, 933, 830, 752, 650



$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度); 200.4 (s), 172.6(s), 159.8 (s), 146.2 (d), 138.5 (s), 133.5 (d), 131.8 (d), 130.7 (d), 127.7 (s), 124.3 (d), 118.7 (d), 112.1 (t), 93.2 (s), 90.6 (d), 60.9 (d), 56.6 (d), 56.6 (d), 53.1 (d), 50.7 (d), 49.6 (q), 49.0 (t), 46.2 (t), 45.6 (t), 41.6 (s), 41.5 (s), 28.0 (d), 27.3 (d), 26.0 (t), 25.8 (q), 22.8 (q), 20.9 (q), 19.8 (q), 16.1 (q)

$^1\text{H}$ -NMRスペクトル (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数 J (Hz)); 7.13 (1H, dd, J=8.1, 2.2), 6.94 (1H, dd, J=8.6, 2.4), 6.87 (1H, dd, J=8.6, 2.2), 6.81 (1H, dd, J=8.1, 2.4), 5.54 (1H, br.), 5.44 (1H, dd, J=17.6, 10.7), 4.91 (1H, br.), 4.90 (1H, dd, J=17.6, 1.0), 4.85 (1H, dd, J=10.7, 1.0), 4.24 (1H, dd, J=7.7, 4.5), 3.54 (1H, d, J=10.1), 3.26 (3H, s), 3.03 (1H, dd, J=11.8, 5.1), 2.91 (1H, d, J=13.1), 2.86 (1H, d, J=13.1), 2.66-2.56 (2H, m), 2.00-1.87 (4H, m), 1.87 (3H, d, J=1.1), 1.87-1.76 (2H, m), 1.19 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.11 (3H, d, J=6.3), 1.08 (1H, dd, J=11.2, 7.7), 0.91 (3H, d, J=6.2), 0.80 (1H, dd, J=12, 12), 0.63 (1H, ddd, J=12, 12, 12)

溶解性: メタノール、クロロホルムに易溶

呈色反応: ヨウ素、硫酸に陽性

薄層クロマトグラフィー(Rf値): 0.59

展開溶媒: 98:2 クロロホルム/メタノール

薄層: HPTLC-Platten kieselgel 60 F<sub>254</sub> (メルク社製)

展開方法: 室温、上昇法、20分

検出: 硫酸発色

【0060】(GKK1032A<sub>2</sub>の理化学的データ)

性状: 白色の固体

融点: 147-148°C

分子量: 503

分子式:  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{NO}_4$

FABマスペクトル: m/z

ポジティブモード: 504 (M+H)<sup>+</sup>

ネガティブモード: 502 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能FABマスペクトル: m/z

ポジティブモード: 測定値; 504.3126 (M+H)<sup>+</sup>

$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{NO}_4$ としての計算値; 504.3114

比旋光度:  $[\alpha]_D^{19} = +104^\circ$  (c 0.2,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

紫外外部吸収スペクトル:  $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH})$  nm( $\epsilon$ ); 203 (17,400), 226 (sh. 6,200)

【0061】赤外部吸収スペクトル:  $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})$   $\text{cm}^{-1}$ ; 3275, 2950, 2924, 2864, 1688, 1604, 1507, 1453, 1366, 1226, 1165, 1107, 1086, 1058, 1006, 959, 924, 834, 753, 644

$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度); 200.2 (s), 171.8(s), 159.8 (s), 146.3 (d), 138.5 (s), 133.3 (d), 131.5 (d), 130.7 (d), 127.9

(s), 124.4 (d), 118.8 (d), 112.0 (t), 90.7 (d), 88.8 (s), 60.9 (d), 56.7 (d), 56.7 (d), 53.0 (d), 50.6 (d), 49.0 (t), 47.0 (t), 45.5 (t), 41.6 (s), 41.5 (s), 33.4 (t), 28.0 (d), 27.3 (d), 25.7 (q), 22.8 (q), 20.9 (q), 19.8 (q), 16.0 (q)

$^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数 J (Hz)); 7.14 (1H, dd, J=8.1, 2.0), 6.96 (1H, dd, J=8.8, 2.2), 6.92 (1H, dd, J=8.8, 2.0), 6.81 (1H, dd, J=8.1, 2.2), 5.92 (1H, br.), 5.43 (1H, dd, J=17.6, 10.7), 4.91 (1H, br.), 4.89 (1H, dd, J=17.6, 1.0), 4.82 (1H, dd, J=10.7, 1.0), 4.25 (1H, dd, J=7.7, 4.4), 3.52 (1H, d, J=10.0), 3.13 (1H, dd, J=12.0, 4.6), 2.95 (1H, d, J=13), 2.92 (1H, d, J=13), 2.90 (1H, m), 2.77 (1H, br.), 2.62 (1H, ddd, J=13.1, 10.0, 4.4), 1.99-1.86 (3H, m), 1.86 (3H, s), 1.86-1.76 (3H, m), 1.19 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.10 (3H, d, J=6.3), 1.07 (1H, dd, J=11.0, 7.7), 0.91 (3H, d, J=6.3), 0.80 (1H, dd, J=12, 12), 0.62 (1H, ddd, J=12, 12, 12)

溶解性: メタノール、クロロホルムに易溶

呈色反応: ヨウ素、硫酸に陽性

薄層クロマトグラフィー(Rf値): 0.08

展開溶媒: 98:2 クロロホルム/メタノール

薄層: HPTLC-Platten kieselgel 60 F<sub>254</sub> (メルク社製)

展開方法: 室温、上昇法、20分

検出: 硫酸発色

【0062】実施例3: GKK1032A<sub>3</sub>

GKK1032A<sub>1</sub> (0.5mg)を0.1%のトリフルオロ酢酸を含むエタノール(1ml)に溶解し、室温で12時間静置した。溶媒を減圧留去し、残渣を少量のクロロホルムに溶解後、1mlのシリカゲルカラム(シリカゲル60N、関東化学社製)に通塔し、7:3 ヘキサン/酢酸エチルで溶出した。GKK1032A<sub>3</sub>を含む画分を集めて減圧乾固することにより、GKK1032A<sub>3</sub> (0.3mg)を得た。

(GKK1032A<sub>3</sub>の理化学的データ)

分子量: 531

分子式:  $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_4$

FABマスペクトル: m/z

ポジティブモード: 532 (M+H)<sup>+</sup>

ネガティブモード: 530 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能FABマスペクトル: m/z

ポジティブモード: 測定値; 532.3402 (M+H)<sup>+</sup>

$\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{NO}_4$ としての計算値; 532.3427

【0063】 $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数 J (Hz)); 7.13 (1H, d, J=8.1, 2.2), 6.95 (1H, dd, J=8.8, 2.2), 6.86 (1H, dd, J=8.8, 2.2), 6.80 (1H, dd, J=8.1, 2.2), 5.44 (1H, dd, J=17.6, 10.7), 5.27 (1H, br.), 4.91 (1H, br.), 4.89 (1H, dd, J=17.6, 1.1), 4.84 (1H, dd, J=10.7, 1.1), 4.25 (1H, dd, J=7.7, 4.3), 3.56 (1H,

d, J=10.0), 3.50 (1H, dq, J=9.1, 7.0), 3.45 (1H, d, J=9.1, 7.0), 3.01 (1H, dd, J=12.0, 5.4), 2.90 (1H, d, J=12.9), 2.87 (1H, d, J=12.9), 2.67-2.58 (2H, m), 1.99-1.87 (4H, m), 1.87 (3H, d, J=1.5), 1.87-1.77 (2H, m), 1.22 (3H, t, J=7.0), 1.19 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.12 (3H, d, J=6.4), 1.07 (1H, dd, J

=11.3, 7.7), 0.91 (3H, d, J=6.1), 0.80 (1H, dd, J=12, 12), 0.63 (1H, ddd, J=12, 12, 12)

【0064】

【発明の効果】本発明によれば、抗菌または抗腫瘍作用を有する生理活性物質GKK1032化合物を提供することができる。

# フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 P 17/18		C 1 2 P 17/18	C
/(C 1 2 N 1/20		(C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 R 1:80)		C 1 2 R 1:80)	
(C 1 2 P 17/18		(C 1 2 P 17/18	C
C 1 2 R 1:80)		C 1 2 R 1:80)	

(72)発明者 小川 達洋  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 原 光信  
静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社医薬総合研究所内